

生物酶法合成 (*S*)-2-氨基-1-丁醇的研究

程仕伟^{1,2}, 魏东芝², 孙爱友²

(1. 鲁东大学生命科学学院, 山东 烟台 264025;

2. 华东理工大学生物反应器工程国家重点实验室, 鲁华生物技术研究, 上海 200237)

摘要: 以粪产碱杆菌来源的青霉素 G 酰化酶为催化剂, 酶法拆分苯乙酰消旋底物转化生成 (*S*)-2-氨基-1-丁醇。通过对催化过程中加酶量、底物浓度、反应温度、pH 进行优化, 确定最适酶催化条件是 pH 9.0, 40℃, 底物浓度 100 mmol/L, 酶量 2 U/mL, 反应体积 80 mL。在最适反应条件下, 当消旋底物转化率达 40% 时终止反应可获得较高的产物光学纯度 (ee > 99%)。

关键词: 青霉素 G 酰化酶; 2-氨基-1-丁醇; 生物催化

中图分类号: Q819; O643.32

文献标识码: A

文章编号: 0253-4320(2011)01-0052-03

Enzymatic preparation of optically pure (*S*)-2-amino-1-butanol

CHENG Shi-wei^{1,2}, WEI Dong-zhi², SUN Ai-you²

(1. College of Life Sciences, Ludong University, Yantai 264025, China; 2. State Key Laboratory of Bioreactor Engineering, New World Institute of Biotechnology, East China University of Science and Technology, Shanghai 200237, China)

Abstract: With the source of *Alcaligenes faecalis* penicillin G acylase as catalyst, optically pure (*S*)-2-amino-1-butanol is obtained via enantioselective hydrolysis of *N*-phenylacetyl racemic 2-amino-1-butanol. The optimal conditions of catalytic process are as follows: 2 U/mL of enzyme, 100 mmol/L of substrate concentration, 40℃ of reaction temperature, 9.0 of pH. Under the optimal conditions, the higher optical purity (ee > 99%) can be obtained when the racemic substrate conversion rate of 40% is achieved.

Key words: penicillin G acylase; 2-amino-1-butanol; biocatalysis

乙胺丁醇 (Ethambutol) 为有效的抗结核药, 用于经其他抗结核药治疗无效的病例, 常与其他抗结核药联合应用, 以增强疗效并延缓细菌耐药性的产生。世界目前需求量为 1 250 t/a, 其用量占抗结核药药物市场份额的 13% 以上^[1]。目前乙胺丁醇合成主要有直接法和间接法。直接法以 (*S*)-2-苄氨基-1-丁醇^[2]、(*S*)-2-氨基丁酸乙酯^[3] 等为原料进行相应反应获得, 但是存在原料难获得、步骤复杂的问题, 应用较少。间接法是合成乙胺丁醇最常用的方法, 但是需要关键中间体 (*S*)-2-氨基-1-丁醇。(*S*)-2-氨基-1-丁醇的生产普遍采用拆分其消旋体的方法, 主要通过从甲醇或水中分级结晶光学纯活性酸 (如扁桃酸、酒石酸、谷氨酸) 的盐实现的, 但获得产物光学纯度不高, 且存在环境污染的问题^[4]。相对化学法来说, 酶法在高光学纯度化合物合成方面具有独特的优势, 获得产品光学纯度高^[5], 可开辟全新或者更加环保的反应路线^[6]。因此开发污染小、步骤简单、产品得率高且质量好的酶法新工艺就显得尤为重要。笔者采用粪产碱杆菌青霉素 G 酰化酶的固定化形式作为催化剂, 通过拆分苯乙酰

化的消旋底物转化生成 (*S*)-2-氨基-1-丁醇, 探讨酶法生产该产品的可行性。

1 实验部分

1.1 主要试剂与仪器

(*RS*)-2-氨基-1-丁醇和 (*S*)-2-氨基-1-丁醇标准品, Alfa 公司; 固定化粪产碱杆菌青霉素 G 酰化酶 (220 U/g 湿载体), 自制; 其余试剂均为市售分析纯。Agilent 1100 series 高效液相色谱仪 (HPLC); XT4A 控温型显微熔点仪; Agilent 公司 XDB-C18 柱; 日本 Daicel 化学工业公司 OJ-H 柱; 酶催化反应装置, 自制。

1.2 制备步骤

1.2.1 *N*-苯乙酰-(*RS*)-2-氨基-1-丁醇合成

将苯乙酸甲酯 (15 g) 和 (*RS*)-2-氨基-1-丁醇 (8.9 g) 加入到圆底烧瓶中, 油浴加热到 140℃ 回流反应 24 h, 用氯仿-正己烷重结晶, 获得白色粉末状的产物。收率为 95%, 熔点为 65℃。

1.2.2 酶法拆分合成 (*S*)-2-氨基-1-丁醇

取一定量 *N*-苯乙酰-(*RS*)-2-氨基-1-丁醇在

收稿日期: 2010-07-29

基金项目: 国家“863”计划资助项目 (2007AA02Z219); 鲁东大学科研基金项目 (LY20083305)

作者简介: 程仕伟 (1976-), 男, 博士, 讲师, 主要从事酶工程研究, swbiotech@yeah.net; 魏东芝 (1963-), 男, 博士, 教授, 博士生导师, 主要从事生物技术药物研究, 通讯联系人, 021-64237972, dzwei@ecust.edu.cn。

80 mL 双蒸水中加热溶解,倒入自动控温控 pH 的搅拌酶反应器,加入固定化酶进行催化反应。HPLC 检测水解过程,反应完毕后过滤移出固定化酶,用双蒸水清洗固定化酶测定残余酶活。

反应液用 4 mol/L 的盐酸调 pH 至 2.5 后,用 3 倍体积的乙酸乙酯萃取剩余反应物和反应过程中形成的苯乙酸。萃余相蒸馏浓缩,真空干燥除去残存水得(S)-2-氨基-1-丁醇。抽提后乙酸乙酯层加质量分数为 10% 的碳酸钠溶液移去苯乙酸,萃取相旋转蒸发后收集未反应底物,无水硫酸铜干燥除水。

1.3 分析方法

反相 HPLC 检测 *N*-苯乙酰-(*RS*)-2-氨基-1-丁醇的水解过程: XDB-C18 柱,检测波长 198 nm,流动相为体积分数 30% 乙腈和体积分数 70% 的水(0.7 g/L SDS,用磷酸调 pH 为 3.5),柱温为 20℃,进样量为 10 μL,流动率为 1 mL/min。*N*-苯乙酰-(*RS*)-2-氨基-1-丁醇出峰时间为 4.677 min,苯乙酸的出峰时间 7.046 min,产物 2-氨基-1-丁醇没有检出。

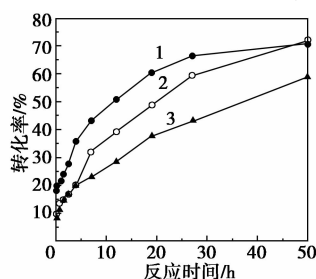
产物纯度检测采用手性 CHIRALCEL OJ-H 柱:检测波长为 220 nm,流动相为体积分数 10% 异丙醇和体积分数 90% 正己烷,流动率为 0.4 mL/min,柱温为 25℃,*R*型 2-[*N*-(苯乙酰)氨基]-1-丁醇的停留时间为 25.268 min,*S*型 2-[*N*-(苯乙酰)氨基]-1-丁醇的停留时间为 17.842 min。

酶活测定采用 PDAB 法^[7]: pH 8.0、37℃ 下,1 min 转化生成 1 μmol 6-APA 为一个酶活力单位。

2 结果与讨论

2.1 底物浓度对酶催化的影响

初始条件:反应体积 80 mL,投酶量 40 U,温度 30℃,pH 8.0。底物 *N*-苯乙酰-(*RS*)-2-氨基-1-丁醇在水溶液溶解性相对较差,当其超过 150 mmol/L 时,即使加热也有部分底物难以溶解。为更好定量测定底物浓度对酶催化反应影响,选取 50、100、150 mmol/L 3 个浓度梯度。由图 1 看出,随着底物浓度

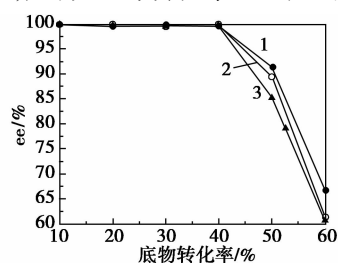


底物浓度/mm \cdot L⁻¹: 1—50; 2—100; 3—150

图 1 底物浓度对酶催化反应转化率的影响

增加,在相同反应时间内其转化率逐渐降低,50 mmol/L 和 100 mmol/L 之间差别较小,而 100 mmol/L 与 150 mmol/L 之间的转化率差别较大。考虑在 150 mmol/L 时底物不能完全溶解,故取底物浓度为 100 mmol/L 进行研究。

不同底物浓度下转化率与产物 ee 的关系见图 2。底物水解前期 ee 均较高。转化率 < 40% 时的 ee 均在 99% 以上,说明粪产碱杆菌青霉素 G 酰化酶对底物的选择性较好,优先水解 *S*-底物。转化率超过 40% 时,ee 逐渐下降,此时 *R*-底物也开始被酶催化水解,且随着底物浓度的增加,ee 略有下降。一定条件下,产物 ee 与转化率呈一定对应关系。

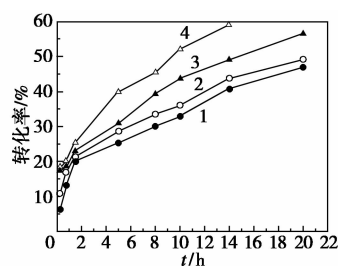


底物浓度/mm \cdot L⁻¹: 1—50; 2—100; 3—150

图 2 不同底物浓度下转化率与产物 ee 的关系图

2.2 投酶量对酶催化的影响

投酶量对转化率的影响如图 3 所示。随着投酶量的增加,在相同反应时间时转化率逐渐增高。在投酶量为 160 U 时反应 8 h,底物转化率为 45.56%。当投酶量为 160 U 而反应溶液为 80 mL 时,体系中酶活单位为 2 U/mL,投酶量已较大。考虑到固定化酶的价格因素,如再增加投酶量会增加生产成本,而且催化过程中发现如果投酶量太大,产物 ee 明显降低,故采用投酶量为 2 U/mL。



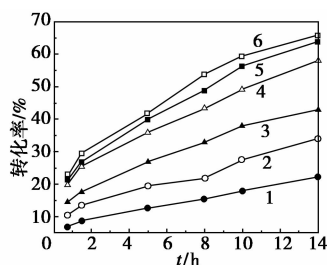
投酶量/U: 1—40; 2—80; 3—120; 4—160

图 3 投酶量对底物转化率的影响

2.3 pH 对酶催化的影响

pH 对底物转化率的影响见图 4。在酸性条件下底物的转化率较碱性条件下要低,并且在相同反应时间时转化率随着 pH 的升高而逐渐升高。在

碱性条件下虽然随 pH 的升高转化率略有升高,但是在相同反应时间时转化率差别不是很大。从防止酶失活及较短时间内获得较大底物转化率的角度考虑,采用反应体系的 pH 为 9.0。

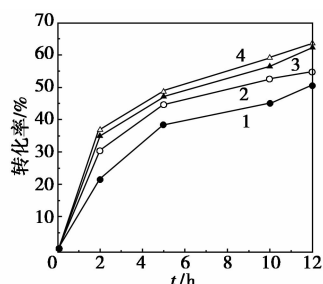


pH: 1—5.0; 2—6.0; 3—7.0; 4—8.0; 5—9.0; 6—10.0

图 4 pH 对酶催化的影响

2.4 温度对酶催化的影响

温度对酶催化拆分底物的影响见图 5。反应条件为:80 mL 反应体积, pH 9.0, 投酶量 160 U, 底物浓度 100 mmol/L。温度对底物转化率的影响较明显,随着温度的升高,底物的转化率逐渐升高。如果温度超过 40℃, 转化率虽然随温度的升高略有增加,但是增加的幅度并不大。



温度/℃: 1—20; 2—30; 3—40; 4—50

图 5 温度对酶催化的影响

通过对反应 12 h 后不同反应温度下的剩余酶活的比较(表 1)看出,当反应体系温度相对较低($\leq 40^\circ\text{C}$)时,剩余酶活变化不大。当超过 50°C 时,酶失活得较多。在 50°C 下反应 8 h 后,仅有 26% 酶活。从防止酶过多失活和短时间内获得较大转化率 2 方面考虑,采用反应温度为 40°C 。

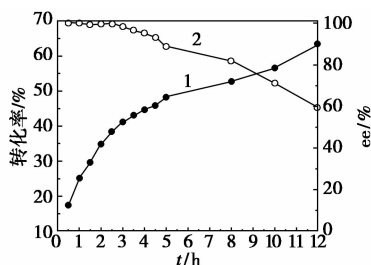
表 1 催化过程的残余酶活比较

温度/℃	20	30	40	50
残余酶活/%	64.4	65.1	62.7	26.0

2.5 最适条件下酶催化分析

最适反应条件(pH 9.0、反应温度 40°C 、底物浓度 100 mmol/L、酶量 2 U/mL、反应体积 80 mL)下拆分消旋底物生成(S)-2-氨基-1-丁醇的过程见图 6。

在该条件下反应的速率较快,随着反应时间的延长,转化率逐渐增大。就产物 ee 来说,当转化率为 38.4% 时 ee 为 99.7%; 41.1% 时 ee 为 98.6%; 当转化率为 44.5% 时 ee 为 95.1%; 转化率为 52.6% 时,测得的 ee 为 81.6%。而大肠杆菌来源的青霉素酰化酶催化同底物反应在转化率为 50% 时,其 ee 低于 70%^[8],粪产碱杆菌来源的酶在拆分底物时具有明显的优势。综合底物转化率和产物 ee 两方面的因素,在转化率为 40% 时终止反应较合适,可以获得较高的产物光学纯度。经测定产物 ee > 99%, 实际产量约占液相产量的 89%。



1—转化率; 2—ee

图 6 最适反应条件下拆分底物过程分析

3 结语

(S)-2-氨基-1-丁醇作为乙胺丁醇的合成前体,探索其新型的制备工艺具有重要意义。笔者采用酶法制备(S)-2-氨基-1-丁醇,通过系统优化确定最适酶催化条件是 pH 9.0, 反应温度 40°C , 底物浓度 100 mmol/L, 投酶量 2 U/mL, 反应体积 80 mL。在最适反应条件下,消旋底物的转化率为 40% 时终止酶催化反应可获得高光学纯度。该工艺路线简单、对环境污染小,具有深入研究和推广价值。

参考文献

- [1] 董增贺. 乙胺丁醇的合成工艺论述[J]. 辽宁医药, 2005 (2): 13-17.
- [2] Barry M T, Richard C B, Remy C L. Dynamic kinetic asymmetric transformation of diene monoepoxides: A practical asymmetric synthesis of vinylglycinol, vigabatrin, and ethambutol[J]. J Am Chem Soc, 2000, 122: 5968-5976.
- [3] 张世和, 白国义. 乙胺丁醇的合成研究进展[J]. 精细与专用化学品, 2005, 13(8): 13-25.
- [4] Ács M, Szili T, Fogassy E. New method of optical activation for racemic bases[J]. Tetrahedron Lett, 1991, 32: 7325-7328.
- [5] Edegger K, Mang H, Faber K. Biocatalytic oxidation of secalcohols via hydrogen transfer[J]. J Mol Catal A: Chemical, 2006, 251: 66-70.

(下转第 56 页)

1 实验方法和原理

1.1 纳米/准纳米 Al_2O_3 -M 金属陶瓷阳极的制作

Al_2O_3 -M 金属陶瓷阳极制作过程如图 1 所示。由图 1 可知, Al_2O_3 混合 Y_2O_3 、 CeO_2 组成氧化物微米粉料, 经高能球磨细化到 50 ~ 300 nm。图 2 是 Al_2O_3 -M 纳米/准纳米粉的 SEM 照片, 由图 2 可见大部分颗粒在 50 ~ 300 nm 的纳米/准纳米范围内, 并有大量纳米颗粒团聚, 表现出极强的表面活性。以上纳米粉末混合 Fe、Ni 为主的金属粉末并添加 Y 后, 再进行 10 ~ 14 h 的常规球磨。

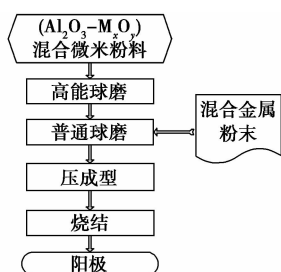


图 1 Al_2O_3 -M 金属陶瓷阳极制作流程图

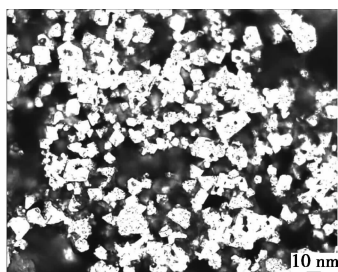


图 2 Al_2O_3 -M 纳米/准纳米粉的 SEM 照片

压成型过程包括金属模机械压成型和冷等静压压实两步, 压力为 200 MPa。烧结采用氩气保护炉, 根据物料不同, 温度在 1 400 ~ 1 550℃。烧结后阳极的横断面收缩率为 69% ~ 70%, 纵向收缩率为 88% ~ 90%。

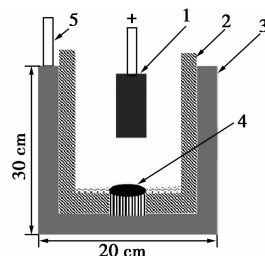
因为氧化物粉末与金属粉末的互溶性和润湿性很差, Al_2O_3 和 Fe-Ni 组成的混合粉末成型性也差。但 Al_2O_3 等氧化物研磨到纳米级别后, 表面活性大幅度增加, 显著提高了 Al_2O_3 与金属粉末间的互溶性和润湿性; 而且在普通球磨过程中, 部分 Al_2O_3 纳米粉末会嵌入大颗粒、塑性好的金属颗粒中。这两

方面提高了惰性阳极的机加工性、成型性和寿命。高能球磨后的阳极成型率提高到 95% 以上, 烧结产物的致密度高达 80% 以上, 裂纹倾向性低; 而未经高能球磨的微米氧化物成型率仅在 60% 左右, 裂纹倾向性高。

使用日本 NTK 陶瓷车刀, 可以在这种烧结成型的惰性阳极外围加工出粗牙螺纹, 连接带有内螺纹的不锈钢导电底座。

1.2 铝电解实验的电解槽

铝电解实验装置如图 3, Al_2O_3 -M 惰性阳极通过螺纹、铜质软母线连接电源。石墨坩埚加装刚玉绝缘侧壁, 保证电流只能通过坩埚底部的碳块进入电解质。



1— Al_2O_3 -M 阳极; 2—刚玉内衬; 3—石墨坩埚;
4— TiB_2 阴极; 5—铜阴极

图 3 铝电解实验装置

1.3 电解铝实验的工艺

电解温度 880 ~ 920℃, 极间距 4 cm, 电流密度为 1.0 ~ 1.2 A/cm², 电解质中 NaF 与 AlF_3 的摩尔比为 2.2, 电解质由 NaF、 AlF_3 、 CaF_2 、 MgF_2 、 Al_2O_3 和 Na_3AlF_6 组成。根据电解电流强度和铝的电化当量, 每间隔 30 min 加入 5 g 氧化铝。电解 30 h 后, 取出阳极, 敲击清除黏附在表面的电解质后, 在质量分数 30% 的 AlCl_3 水溶液中浸煮 30 min。

2 结果与讨论

2.1 阳极的显微分析

图 4 是经过高温烧结后阳极横截面的显微照片。块状或点状的白亮色金属相均匀地穿插分布于黑色的氧化物相中。在较高的烧结温度下, 部分金属颗粒已熔化并互溶合金化, 最后汇聚于氧化物颗粒之间的空隙中形成粗大的块状 Fe-Ni 合金相, 为

(上接第 54 页)

- [6] 许建和, 谢彦, 赵丽丽, 等. 工业生物催化前线动态及名家观点[J]. 生物加工过程, 2007, 5(1): 1-8.
- [7] Shewale J G, Kumar K K, Ambekar G R. Evaluation of 6-amino peni-

cillanic acid by *p*-dimethylaminobenzaldehyde[J]. Biotechnol Tech, 1978, 1: 715-718.

- [8] Fadnavis N W, Sharfuddin M, Vadivel S K. Resolution of racemic 2-amino-1-butanol with immobilized penicillin G acylase[J]. Tetrahedron: Asymmetry, 1999, 10: 4495-4500. ■